



CITOTOXICIDAD DE UNA ASPARTIL PEPTIDASA DE *Salpichroa organifolia* FRENTE A LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN ZAPALLITOS VERDES (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito)

Citotoxic activity of an aspartic peptidase from *Salpichroa organifolia* against the infection caused on green zucchini (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito) by *Phytophthora capsici*

Gabriela F. Rocha¹✉, María E. Díaz^{1,2}, Adriana M. Rosso¹ y Mónica G. Parisi¹

ABSTRACT. *Phytophthora capsici* is a phytopathogenic agent that causes significant losses in crops of economic interest. The chemicals traditionally used to fight these pathogens cause adverse effects on health and the environment. Native plants represent an alternative source of natural antifungal metabolites. In our laboratory we have studied a perennial herb, *Salpichroa organifolia*, native to the northern and central Argentina whose ovoid fruits are edible berry. An aspartyl peptidase from the crude extract of the ripe fruit of this species was purified by ion exchange chromatography using a batch process. The enzyme was called salpichroína. In this work the antifungal effect of the aspartyl peptidase on *P. capsici* was studied. It was obtained that salpichroína had a high cytotoxic effect *in vitro* on strains of *P. capsici* (MIC: 1.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$). To evaluate the enzyme effect on the development of *P. capsici* *in vivo*, inoculation controlled bioassays on green zucchini (*Cucurbita maximum* var Zapallito) were performed. The fruit inoculated with the phytopathogen and salpichroína remained asymptomatic for seven days.

RESUMEN. *Phytophthora capsici* es un oomicete patógeno que causa importantes pérdidas en la producción de cultivos de interés agroeconómico. Los agroquímicos utilizados tradicionalmente para combatir estos fitopatógenos causan efectos adversos sobre la salud y el medio ambiente. Las plantas de la flora autóctona representan una fuente alternativa de metabolitos antifúngicos naturales. En nuestro laboratorio hemos estudiado la especie *Salpichroa organifolia*, una hierba perenne autóctona del Norte y Centro de Argentina cuyos frutos, en forma de baya ovoide, son comestibles. A partir del extracto crudo de los frutos maduros de esta especie se purificó por cromatografía de intercambio iónico mediante un proceso en batch, una aspartil peptidasa a la cual denominamos salpichroína. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antifúngico de la enzima sobre el patógeno *P. capsici*. Salpichroína presentó un elevado efecto citotóxico sobre *P. capsici* en los ensayos *in vitro*, con un valor de CIM de 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para evaluar el efecto de la enzima sobre el desarrollo de *P. capsici* en vegetales, se realizaron bioensayos de inoculación controlada de zapallitos verdes (*Cucurbita máxima* var Zapallito), observándose que los zapallitos inoculados con salpichroína junto con el fitopatógeno permanecieron asintomáticos durante siete días.

Key words: fungicidas, pathogens, peptidase

Palabras clave: fungicidas, organismos patógenos, peptidasas

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son la principal causa de enfermedades infecciosas en las plantas. El control de estos hongos con fungicidas sintéticos es aún la medida fitotécnica más importante para aumentar los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, la utilización

¹ Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Argentina.

² CONICET.

✉ grocha@unlu.edu.ar

masiva y a veces indiscriminada de estos productos ha incrementado la resistencia de los organismos fitopatógenos además de provocar efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente (1). En este marco se plantea como esencial la búsqueda de agentes antimicrobianos más seguros que puedan sustituir o disminuir el actual uso de agroquímicos. El desarrollo de una agricultura sostenible ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos para el control de enfermedades cuya actividad y seguridad ambiental sea adecuada (2). En este sentido, se están evaluando alternativas naturales, entre las cuales se encuentra el uso de extractos vegetales. Con estos extractos se han obtenido resultados prometedores ya que se ha demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas *in vitro* e *in vivo* (3, 4, 5).

Las plantas han desarrollado un sofisticado sistema inmune innato en respuesta a los patógenos invasores. Es así como la defensa de las plantas implica una variedad de mecanismos celulares entre los que podemos mencionar la generación rápida de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inducción de la respuesta hipersensible (HR) y la producción de moléculas pequeñas (fitoalexinas) y proteínas con actividad antimicrobiana. También se ha descrito la inducción de genes que codifican endopeptidasas con distintos mecanismos catalíticos (6, 7). Las peptidasas cisteínicas están involucradas en muchos aspectos del desarrollo y fisiología de las plantas incluyendo senescencia, embriogénesis, desarrollo de flores y respuesta a distintos tipos de estrés ambiental (8). Además, la acción farmacológica de las peptidasas cisteínicas de plantas ha sido reconocida en investigaciones como potenciales drogas para combatir enfermedades bacterianas y fúngicas (9, 10). Por otro lado, las peptidasas aspárticas (APs) de origen vegetal han sido descritas como una parte fundamental del mecanismo de defensa de las plantas frente a la infección por microorganismos patógenos (11).

En nuestro laboratorio hemos estudiado la especie *Salpichroa organifolia*, una hierba perenne autóctona del Norte y Centro de Argentina, Uruguay y Brasil. Los frutos de esta especie tienen forma de baya ovoide, son comestibles y comúnmente llamados huevitos de gallo. En extractos crudos de los frutos maduros se encontró una peptidasa. A partir de dicho extracto se purificó por cromatografía de intercambio aniónico y caracterizó esta AP a la cual denominamos salpichroína (12).

Por otra parte, se ha descrito que el oomicete *P. capsici* causa la putrefacción y tizón tardío de una gran variedad de huéspedes, incluidos muchos de los miembros de la familia Solanaceae y Cucurbitaceae así como Fabaceae. Entre los cultivos de interés agroeconómico afectados se encuentran los cultivos de papa, de batata, de tomate, de pimiento, de

berenjena y de zapallitos. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad citotóxica de la AP purificada a partir de frutos maduros de *S. organifolia* frente a la infección causada por *P. capsici* en zapallitos verdes (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Como fuente de enzimas proteolíticas se emplearon los frutos maduros de la especie *Salpichroa organifolia* (Lam.) Baill. recolectados en la localidad de Luján, provincia de Buenos Aires, República de Argentina. El fruto maduro es una baya ovoide, blanda, de color blanquecino y sabor dulce.

Preparación del extracto crudo: Los frutos se trituraron con etanol a -8°C . El precipitado se resuspendió en buffer fosfato de potasio 50 mM de pH 7,0 (4°C) y se obtuvo un extracto al 15% (p/V). Esta preparación enzimática se denominó extracto crudo (EC).

Determinación de la actividad proteolítica: La determinación de la actividad proteolítica fue realizada utilizando caseína como sustrato (13). La reacción se inició con el agregado de 100 μL de la solución enzimática a 900 μL de solución de caseína al 0,5 % (p/V) en buffer fosfato de potasio 50 mM de pH 6,0 y luego de 15 minutos de incubación a 40°C , la reacción se detuvo con el agregado de 1 mL de TCA al 5 % (p/V). La suspensión se dejó en reposo durante 20 minutos en baño de hielo y luego fue centrifugada durante 10 min a 14000 rpm. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm para determinar los péptidos solubles obtenidos por digestión proteolítica. La Unidad de actividad caseinolítica (Ucas) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de una unidad de absorbancia por minuto a 280 nm en las condiciones del ensayo.

Determinación de la concentración de proteínas: La concentración de proteínas fue estimada por el método de Bradford (14) empleando albúmina sérica bovina como estándar para la construcción de la curva de calibración.

Purificación de la AP: La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico con una resina de DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) equilibrada en buffer fosfato de potasio 50 mM de pH 7,0. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0,0-0,6 M) con un flujo constante de 1 mL min^{-1} . La fracción activa fue desalada por cromatografía de exclusión molecular con resinas de Sephadex G-10 y almacenada a -20°C para posteriores ensayos. La fracción activa eluida de la columna cromatográfica fue analizada por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (15 %),

en condiciones reductoras y no reductoras y a temperatura ambiente (15). Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) y con plata (16). En la electroforesis SDS-PAGE se emplearon patrones de bajo peso molecular (Low Molecular Weight Range Sigma Marker producto N° 3913M). Para los zimogramas se aplicó la técnica de Kleiner y Stetler-Stevenson (17). Después de la corrida electroforética, el gel se incubó durante la noche en buffer de citrato de sodio (pH 4,0) con CaCl_2 20 mM a 40 °C. Luego del lavado, el gel se tiñó con CBB R-250 para el análisis de zimografía. El desarrollo de una banda clara en el fondo azul del gel indicó la presencia de actividad de la peptidasa.

Actividad antifúngica *in vitro*: El fitopatógeno empleado en este estudio (*P. capsici*) fue aislado y caracterizado por el grupo de investigación de Fitopatología de la Universidad Nacional de Luján, a partir de vegetales de producción local, de la zona Noreste de la provincia de Buenos Aires. Para determinar la actividad antifúngica de salpichroína, discos de agar de 0,5 cm de diámetro con crecimiento de micelio de la cepa fúngica estudiada fueron incubados con salpichroína ($2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), buffer fosfato de sodio 50 mM de pH 7,0 o agua durante 24 horas. Los discos de agar fueron luego colocaron en placas de Petri que contenían medio V8 (34 % de jugo de ocho vegetales V8® y 3 % de agar) específico para el crecimiento de *P. capsici*. Se colocó un disco de agar por placa y los ensayos se realizaron por duplicado. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante diez días. Al cabo de tres y diez días se controló el efecto inhibitorio de la enzima sobre el crecimiento del micelio de la especie fúngica.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se definió como la concentración mínima de salpichroína que produjo total inhibición en el crecimiento de *P. capsici*. Para ello, se incubó un disco de agar de 0,5 cm de diámetro con crecimiento de micelio de la cepa fúngica con distintas concentraciones de la enzima (0,0- 0,6- 1,2- 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$) en medio líquido V8 (10 %) a 25°C durante 48 horas. La CIM se determinó visualmente y correspondió a la menor concentración de salpichroína en la que no hubo desarrollo miceliar del oomicete.

Inoculación controlada del fitopatógeno *P. capsici* sobre zapallitos verdes: Para evaluar el efecto de salpichroína sobre el desarrollo de *P. capsici* en vegetales se realizaron bioensayos de inoculación controlada. Se emplearon zapallitos verdes (*Curcubita máxima* var Zapallito), adquiridos en comercios de la ciudad de Luján, Bs As. En primer lugar se lavó cuidadosamente la superficie del vegetal con agua, para no producir lesiones. Se hicieron heridas de 3 mm de profundidad en la región ecuatorial del vegetal con una aguja de disección estéril para favorecer

la infección. El bioensayo consistió en colocar un disco de agar del medio de cultivo V8 con micelio de *P. capsici* en activo crecimiento sobre la herida realizada en la piel de los zapallitos limpios. Sobre el cultivo se colocó 50 μL de una solución estéril de salpichroína ($2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) o el mismo volumen de agua estéril para el caso del control positivo. Para los controles negativos se usaron discos de agar estéril, sin enzima ni el patógeno. Para cada tratamiento se hicieron tres réplicas y el ensayo completo se repitió dos veces. Todos los vegetales fueron incubados a 25 °C en cámara húmeda y con luz alternada.

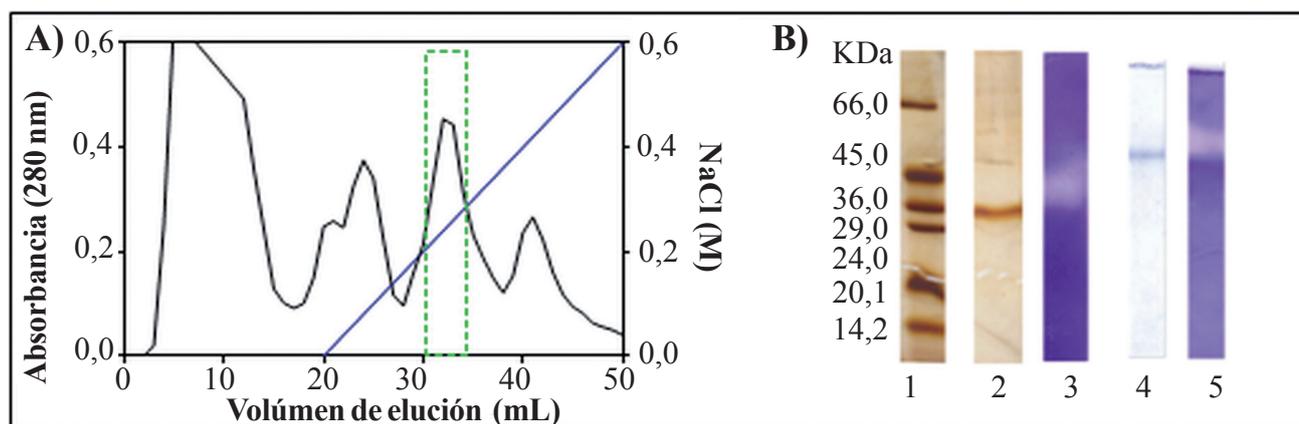
El desarrollo de la infección se evaluó diariamente desde los dos días después de la inoculación y durante siete días, registrándose como el porcentaje de heridas infectadas por réplica y calculando la media y la desviación estándar para cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA PURA

Se preparó un EC de frutos maduros de *Salpichroa organifolia* cuya concentración de proteínas fue de 0,5 mg mL^{-1} y con una actividad proteolítica de 145 Ucas mL^{-1} . Si bien en trabajos previos se realizó la purificación de la enzima mediante un sistema FPLC (12), en este trabajo la purificación a partir del EC se realizó en batch utilizando una cromatografía de intercambio aniónico con una resina DEAE-Sepharose. Esta técnica permitió obtener una mayor biomasa de enzima pura necesaria para ser utilizada en los ensayos de inhibición microbiana. En el perfil cromatográfico se observaron cinco picos de absorbancia a 280 nm de los cuales sólo uno presentó actividad caseinolítica (Figura 1A). La fracción activa obtenida fue analizada por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se observó una única banda con peso molecular aparente de 32 kDa cuando la muestra se preparó en condiciones no reductoras (Figura 1B, calle 2). No se observaron diferencias en el perfil electroforético cuando la muestra se preparó en condiciones reductoras y calentadas a 90°C (dato no mostrado). La pureza de la enzima fue evaluada también por electroforesis nativa y se observó la presencia de una única banda proteica (Figura 1B, calle 4). De la misma manera, en el zimograma correspondiente se observó una única banda con movilidad relativa similar a la obtenida en el gel, indicando la homogeneidad de la enzima purificada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos electroforéticos, se estimó el peso molecular de la enzima salpichroína en 32 kDa, valor que es del mismo orden que el obtenido para otras APs de origen vegetal como las APs de tomate (37 kDa) (18) y tabaco (36-40 kDa) (19), la AP de papa (38 kDa) (20) y la AP de *Ficus racemosa* (44 kDa) (21).



B: calle 1: marcador de bajo peso molecular (M3913, Sigma), calle 2: fracción activa de la cromatografía de intercambio aniónico, teñido con plata, calle 3: zimograma de dicha fracción, calle 4: electroforesis nativa (10 %) fracción purificada, calle 5: electroforesis nativa (10 %) zimograma fracción purificada

Figura 1. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose Fast Flow) del extracto crudo de *Salpichroa organifolia* (A) y electroforesis SDS-PAGE (15 %) en condiciones no reductoras (B)

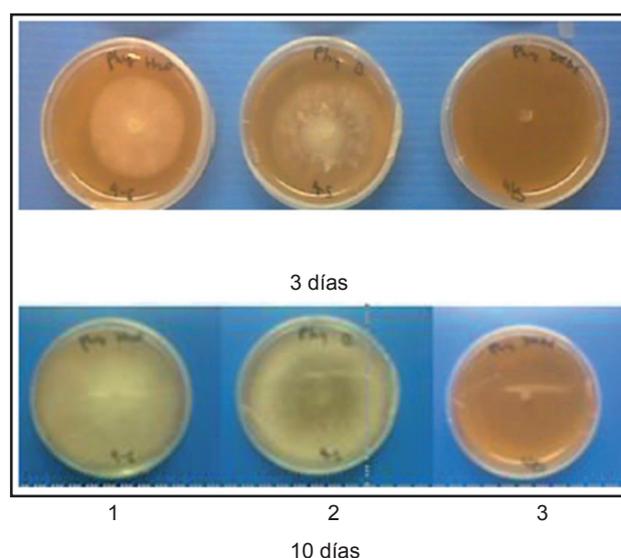
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE SALPICHROÍNA

Se ha informado en la bibliografía la presencia de múltiples actividades biológicas asociadas a las peptidasas, entre ellas la actividad antifúngica. Se encontró que la bromelina purificada a partir de los tallos de piña era un potente inhibidor de patógenos fúngicos de plantas y que esa actividad estaba asociada a su actividad proteolítica (7). Por otra parte se informó que la actividad antifúngica de las APs de papa estaba relacionada con la presencia del PSI en la enzima madura (22). Por este motivo se inició el estudio de la actividad antifúngica de salpichroína.

En primer lugar se evaluó el efecto inhibitorio de la enzima sobre el desarrollo micelial de *P. capsici* (sección Materiales y Métodos). En los ensayos microbiológicos, se encontró que la enzima ejercía un fuerte efecto citotóxico sobre cepas de *P. capsici* ya que no se observó desarrollo del micelio luego de la incubación en la solución enzimática durante los diez días del ensayo (Figura 2). Como era de esperar, se observó desarrollo del micelio de las cepas en las placas que contenían los discos sumergidos en agua y en buffer.

Estos resultados son coincidentes con los informados por otros autores (22) para las APs de hoja y tubérculos de papa, StAP1 y StAP3, las cuales mostraban acción fungicida frente a *Phytophthora infestans* y *Fusarium solani*, plagas que infectan los cultivos de papa. Además, comprobaron que la actividad antifúngica de StAp1 y StAP3 estaba relacionada con la presencia del PSI, dominio específico de las APs, que presenta alta homología estructural con las proteínas del tipo saposinas (SAPLIPs) y que actúa desestabilizando la membrana fosfolipídica del oomicete, provocando la formación de poros y la pérdida de viabilidad celular del patógeno (22).

Phytophthora capsici



El tratamiento 1 corresponde a la preincubación de un disco con micelio fúngico en agua, el 2 en solución 50 mM de buffer fosfato de potasio pH 7,0 y el 3 en solución de salpichroína

Figura 2. Desarrollo de *P. capsici* en medio de cultivo V8 incubados durante 3 y 10 días a temperatura ambiente

De esta forma, la actividad fungicida de salpichroína podría deberse a la potencial presencia del dominio PSI en su forma activa.

Comprobada la actividad citotóxica de la enzima sobre *P. capsici*, se determinó la CIM de salpichroína sobre el crecimiento *in vitro* del microorganismo (Figura 3). El valor de la CIM fue de $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, el cual es del mismo orden que los valores de CIM informados para StAP1 y StAP3 sobre *P. infestans* (22).

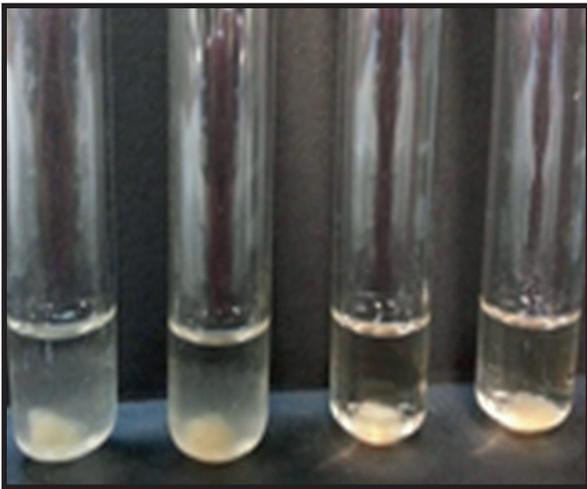


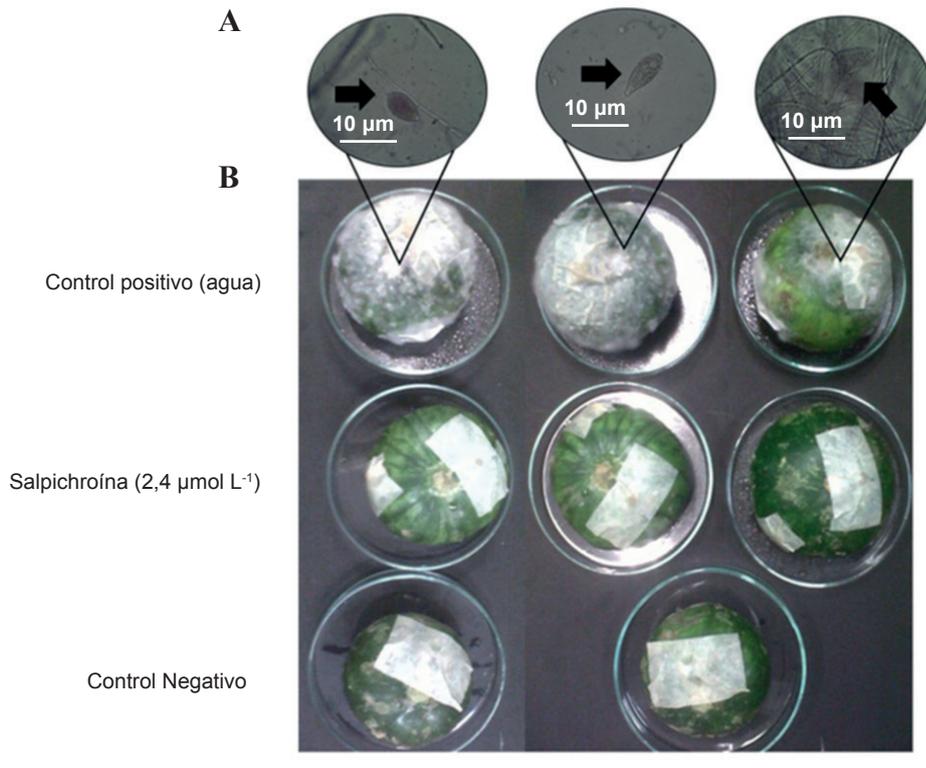
Figura 3. Concentración inhibitoria mínima de salpichroína ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre *P. capsici*

En base a estos resultados podemos inferir que salpichroína presenta interesantes propiedades antimicrobianas sobre el crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *P. capsici*, oomicete que genera grandes pérdidas en la producción de vegetales como zapallitos, pimientos y berenjenas entre otros.

Con el fin de comprobar la actividad citotóxica *in vivo* de la enzima, se llevaron a cabo experimentos de inoculación controlada de salpichroína sobre zapallitos verdes infectados por *P. capsici*.

El bioensayo consistió en colocar un disco de agar con micelio de *P. capsici* en activo crecimiento en la piel de zapallitos limpios. Sobre el cultivo se colocó una solución estéril de salpichroína ($2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) o el mismo volumen de agua estéril para el caso del control positivo. Para los controles negativos se usó solo un disco de agar sin ningún tratamiento previo. Se incubó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en cámara húmeda durante siete días y se registró la severidad de la lesión. Después de la incubación se observaron signos de patogenicidad sobre todos los controles positivos.

Las muestras tomadas de la superficie de dichos frutos confirmaron que se trataba de *P. capsici* debido a la presencia de esporangios con pedicelos típicamente largos (Figura 4 A).



A: imagen al microscopio óptico (40x) de *P. capsici* tomada de la superficie de los controles positivos

B: bioensayo constituido por control positivo (agua y *P. capsici*), muestras (salpichroína y *P. capsici*) y control negativo (agua y agar estéril, sin *P. capsici*) sobre zapallitos verdes

Figura 4. Imágen de una de las réplicas de tres zapallitos utilizadas en el experimento de biocontrol

Los zapallitos sobre cuyos inóculos fue colocada la solución de enzima no presentaron signos de infección y al igual que los controles negativos permanecieron asintomáticos (Figura 4 B). Este comportamiento se repitió en todas las réplicas del ensayo.

De acuerdo a estos resultados, la aspartil peptidasa salpichroína aislada de frutos maduros de *S. organifolia*, podría controlar la infección de *P. capsici* sobre zapallitos verdes, en la etapa de poscosecha.

CONCLUSIONES

- ◆ Debido a que el control de hongos fitopatógenos con fungicidas sintéticos ha incrementado la resistencia de estos organismos, se están evaluando alternativas naturales como extractos vegetales. Se han obtenido resultados prometedores ya que se ha demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas *in vitro* e *in vivo*. En particular, se ha demostrado que las peptidasas de origen vegetal poseen actividad antimicrobiana.
- ◆ En este trabajo hemos purificado una AP de frutos maduros de *S. organifolia* por cromatografía de intercambio iónico mediante un proceso en batch. Además, hemos demostrado que la enzima purificada (salpichroína) presenta un efecto citotóxico sobre el fitopatógeno *Phytophthora capsici* ya que inhibe su crecimiento. Esto se pudo demostrar tanto *in vitro* como *in vivo*, realizando ensayos de inoculación controlada sobre zapallitos verdes.
- ◆ A partir de estos resultados podemos afirmar que salpichroína puede controlar la infección de *P. capsici* sobre zapallitos verdes, probablemente por la actividad antifúngica del PSI de las APs que puede interactuar con la membrana celular del oomicete provocando la pérdida de viabilidad celular.
- ◆ Estos resultados son muy promisorios ya que la búsqueda de compuestos naturales de origen vegetal para el control de plagas que afectan cultivos de importancia agroalimentaria es un tema de interés social y económico.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo son parte de la tesis doctoral de la Ing. Gabriela Rocha. Agradecemos el financiamiento recibido del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján, del Programa de Subsidios para Investigación de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC 2013) y del Programa de Redes Internacionales de la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hahn, M. "The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study". *Journal of Chemical Biology*, vol. 7, no. 4, 28 de mayo de 2014, pp. 133-141, ISSN 1864-6158, 1864-6166, DOI 10.1007/s12154-014-0113-1.
2. Villa, M. A.; Pérez, L. R.; Morales, M. H. A.; Basurto, S. M.; Soto, P. J. M. y Martínez, E. E. "Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales". *Acta Agronómica*, vol. 64, no. 2, 2014, pp. 194-205, ISSN 2323-0118.
3. Valenzuela, N. L.; Nieto Ángel, D.; Téliz Ortiz, D.; Alatorre Rosas, R.; Orozco Santos, M. y Ortiz García, C. F. "Antifungal potential of extracts from four vegetables species on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest papaya (*Carica papaya*)". *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 4, no. 1, 2013, pp. 47-62, ISSN 2218-4384, CABDirect2.
4. Bálint, J.; Turóczy, B.; Máthé, I.; Benedek, K.; Szabó, K.-A. y Balog, A. "In vitro and in vivo effect of poplar bud (*Populi gemma*) Extracts on late blight (*Phytophthora infestans*)". *Acta Universitatis Sapientiae, Agriculture and Environment*, vol. 6, no. 1, 2014, pp. 5-12, ISSN 2068-2964, DOI 10.2478/ausae-2014-0007.
5. Ramaiah, A. K. y Garampalli, R. K. H. "In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*". *Asian Journal of Plant Science and Research*, vol. 5, no. 1, 2015, pp. 22-27, ISSN 2249-7412.
6. Kervinen, J. "Phytopsin". En: Barrett A. J., Woessner J. F., y Rawlings N. D., *Handbook of Proteolytic Enzymes*, edit. Elsevier, 2 de diciembre de 2012, pp. 118-124, ISBN 978-0-08-098415-5.
7. López García, B.; Hernández, M. y Segundo, B. S. "Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens". *Letters in Applied Microbiology*, vol. 55, no. 1, 1 de julio de 2012, pp. 62-67, ISSN 1472-765X, DOI 10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x.
8. Barrett, A. J.; Woessner, J. F. y Rawlings, N. D. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. edit. Elsevier, 2 de diciembre de 2012, 1182 p., ISBN 978-0-08-098415-5.
9. Seenivasan, R.; Roopa, L. y Geetha, S. "Investigations on purification, characterization and antimicrobial activity of enzyme papain from *Carica papaya* Linn". *Journal of Pharmacy Research*, vol. 3, no. 5, 2010, pp. 1092-1095, ISSN 0974-6943, CABDirect2.
10. Ramos, M. V.; Souza, D. P.; Gomes, M. T. R.; Freitas, C. D. T.; Carvalho, C. P. S.; Júnior, P. a. V. R. y Salas, C. E. "A Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*". *The Protein Journal*, vol. 33, no. 2, 5 de marzo de 2014, pp. 199-209, ISSN 1572-3887, 1573-4943, DOI 10.1007/s10930-014-9551-4.

11. Breitenbach, H. H.; Wenig, M.; Wittek, F.; Jordá, L.; Maldonado-Alconada, A. M.; Sarioglu, H.; Colby, T.; Knappe, C.; Bichmeier, M.; Pabst, E.; Mackey, D.; Parker, J. E. y Vlot, A. C. "Contrasting Roles of the Apoplastic Aspartyl Protease APOPLASTIC, *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*-DEPENDENT1 and LEGUME LECTIN-LIKE PROTEIN1 in Arabidopsis Systemic Acquired Resistance,". *Plant Physiology*, vol. 165, no. 2, 1 de junio de 2014, pp. 791-809, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.114.239665, PMID: 24755512.
12. Rocha, G. F.; Obregon, W. D.; Munoz, F.; Guevara, M. G.; Fernandez, G.; Rosso, A. M. y Parisi, M. G. "Isolation and characterization of an Aspartic Protease from *Salpichroa origanifolia* Fruits". *Protein and peptide letters*, vol. 22, no. 4, 2015, pp. 379-390, ISSN 0929-8665.
13. Parisi, M. G.; Moreno, S. y Fernández, G. "Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities". *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 46, no. 4, abril de 2008, pp. 403-413, ISSN 0981-9428, DOI 10.1016/j.plaphy.2007.11.003.
14. Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, 7 de mayo de 1976, pp. 248-254, ISSN 0003-2697, DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
15. Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, no. 5259, 1970, pp. 680-685, ISSN 0028-0836.
16. Blum, H.; Beier, H. y Gross, H. J. "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels". *Electrophoresis*, vol. 8, no. 2, 1 de enero de 1987, pp. 93-99, ISSN 1522-2683, DOI 10.1002/elps.1150080203.
17. Kleiner, D. E. y Stetlerstevenson, W. G. "Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases". *Analytical Biochemistry*, vol. 218, no. 2, 1 de mayo de 1994, pp. 325-329, ISSN 0003-2697, DOI 10.1006/abio.1994.1186.
18. Rodrigo, I.; Vera, P. y Conejero, V. "Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase". *European Journal of Biochemistry*, vol. 184, no. 3, 1989, pp. 663-669, ISSN 0014-2956.
19. Rodrigo, I.; Vera, P.; Loon, L. C. V. y Conejero, V. "Degradation of Tobacco Pathogenesis-Related Proteins Evidence for Conserved Mechanisms of Degradation of Pathogenesis-Related Proteins in Plants". *Plant Physiology*, vol. 95, no. 2, 2 de enero de 1991, pp. 616-622, ISSN 1532-2548, DOI 10.1104/pp.95.2.616, PMID: 16668027.
20. Guevara, M. G.; Oliva, C. R.; Machinandiarena, M. y Daleo, G. R. "Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase". *Physiologia Plantarum*, vol. 106, no. 2, 1 de junio de 1999, pp. 164-169, ISSN 1399-3054, DOI 10.1034/j.1399-3054.1999.106203.x.
21. Devaraj, K. B.; Gowda, L. R. y Prakash, V. "An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.)". *Phytochemistry*, vol. 69, no. 3, febrero de 2008, pp. 647-655, ISSN 0031-9422, DOI 10.1016/j.phytochem.2007.09.003.
22. Muñoz, F.; Palomares-Jerez, M. F.; Daleo, G.; Villalain, J. y Guevara, M. G. "Possible mechanism of structural transformations induced by StAsp-PSI in lipid membranes". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1838, no. 1, Part B, enero de 2014, pp. 339-347, ISSN 0005-2736, DOI 10.1016/j.bbmem.2013.08.004.

Recibido: 15 de mayo de 2015

Aceptado: 15 de septiembre de 2015

NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial

TUTORIAL

NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

El Centro de Bioplantitas es una institución de investigaciones científicas, adscrita a la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” del Ministerio de Educación Superior de Cuba. El mismo surge en 1987 como un laboratorio de investigaciones y micropropagación de plantas frutales. Desde 1992, tiene como misión desarrollar, aplicar y ofrecer tecnologías, productos, asistencia técnica y servicios académicos de excelencia en el marco de la Biotecnología Vegetal.

El grupo de investigadores, técnicos de laboratorio y otro personal auxiliar altamente calificados, han sido galardonados con premios relevantes de la Academia de las Ciencias de Cuba y con reconocimientos por la labor que realizan en la transferencia de resultados científicos y tecnológicos, la producción de vitroplantitas para el comercio internacional, y la educación postgraduada. Para el trabajo científico cuenta con seis laboratorios: Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, Agrobiología, Interacción Planta-Patógeno, Ingeniería Metabólica, Mejoramiento Genético de Plantas y Computación Aplicada. Todos con las mejores facilidades y un equipamiento de alta calidad para asegurar resultados relevantes.

El Centro de Bioplantitas desde 1997 y, como bienal, desarrolla su Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg), el cual constituye un marco excepcional para el intercambio de conocimientos y experiencias entre científicos, docentes y productores. En este se debaten en forma de Conferencia Magistrales, Talleres y Mesas Redondas durante sesiones de trabajo, los resultados más relevantes y los problemas más acuciantes que enfrenta la biotecnología vegetal cubana y mundial.

Por todo lo anterior, el Comité Organizador de BioVeg2015 en su décima edición se complace en presentarles una muestra representativa de 19 trabajos científicos completos recibidos y siente profunda satisfacción en invitarlos para el próximo BioVeg2017 que se desarrollará en la fecha 22-26 del mes de mayo.

Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial